抗-20诱导的三眠家蚕后丝腺RNA聚合酶和RNA的合成*

林　浩　陈淡贞　朱湘雄　侯能俊
(中国科学院上海昆虫研究所，上海　200025)

陈国瑚　　庄大桓
(中国农业科学院蚕业研究所，镇江　212018)

摘要　蚕在4龄期开始的48小时连续取食抗-20，4眠家蚕被诱导成3眠蚕并吐丝结茧。根据对α-鹅膏蕈碱的敏感性，放线菌素D的抑制作用，DNA需要以及[³H]-UMP掺入酸不可溶物，测定了蚕后丝腺的RNA聚合酶I和II活力。观察到随着抗-20处理后天数的增加，RNA聚合酶在热变性小牛胸腺DNA和内源DNA上转录活性迅速升高，并伴随着RNA合成的迅速增加；而对照组蚕的酶活力和RNA含量仍保持在相当稳定的低水平。

关键词　家蚕　RNA聚合酶　抗-20——三眠蚕诱导剂、

家蚕在2、3、4龄的早期，分别取食抗-20后均能够被诱导成3眠蚕，不进入5龄而吐丝作茧，产生超细纤度茧丝(庄大桓等，1988)。目前已见报道具有这类诱导效应的化合物有SM-1（陆雪芳等，1985），SSP-11（Kiuchi等，1985），KK-42（Kuwano等，1985）等。

昆虫的生长发育，特别是变态都受激素的控制，与之有关的许多特异基因表达的调节是通过蜕皮激素（MH）和保幼激素（JH）的相互协调而实现的，这些激素直接或间接影响基因的转录和翻译（Riddiford, 1985; Steele, 1985）。三眠蚕诱导剂在结构和生理功能上，与MH、JH或JHA是截然不同的。Yamashita等(1987)研究表明KK-42是一种抗MH激素。我们观察到蚕取食抗-20后，蚕体蜕皮激素的合成被明显推迟。本文报告抗-20对蚕后部丝腺RNA聚合酶和RNA合成的影响，以了解这类具有高生物活性的化合物诱导蚕早熟结茧的作用机理。

材料和方法

一、家蚕　丰$_1$×54A品种。

二、试剂　ATP、GTP、CTP、肌酸磷酸钠（CP_{Na}）、肌酸激酶（CPKase）、小牛胸腺DNA均为上海生化所东风厂产品，[³H]-UTP（放射性比度22 ci/mmol、放化纯度>90%）为中国科学院北京原子能研究所出品，苯甲基磺酰氟（PMSF）和α-鹅膏蕈碱

本文于1989年4月收到。
* 国家自然科学基金资助项目。
中国农业科学院蚕业研究所提供实验用蚕和三眠蚕诱导剂抗-20（一种咪唑类化合物）。

(α-Am) 为 E. Merck 产品，放线菌素D为 Sigma 产品。保幼激素类似物 ZR515 为 Zoecon 产品，20-羟基蜕皮酮含量 90%，409 型玻璃纤维空气过滤纸(上海红光造纸厂)。其他试剂均为分析纯。

三、抗-20 对蚕的处理　按照庄大桓等(1988)方法。将抗-20 制成 30 ppm 浓度的水溶液，于 4 龄起蚕后，连续 48 小时取食浸过抗-20 溶液的桑叶。另设对照组。

四、RNA 聚合酶的制备和活力测定

1. 解剖　处理组和对照组同时解剖，迅速取出后部丝腺，用冰冷的生理盐水冲洗，滤纸吸干后即投入干冰中，再转入 −70℃ 冰箱保存。

2. 匀浆和提取　全部操作在 0—4℃ 进行。取一定量后丝腺剪碎，用匀浆缓冲液 [50mmol/L Tris-HCl，pH7.9 含 0.3 mmol/L PMSF，20% 甘油，10 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$，5 mmol/L $MgCl_2$，1mmol/L EDTA 和 1 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT)] 在全玻璃匀浆器中低速匀浆 15 冲程。匀浆液于 17000 g 离心 10 分钟，沉淀部分用适量的相同缓冲液制成悬浮液，作为酶源，上清部分再于 105000 g 离心 60 分钟，取上清液作为酶源。

3. RNA 聚合酶活力测定　主要参考 Sridhara 等(1977)方法并稍加改进。反应总体积 200 μl，包括：50 μl 0.2 mol/L Tris-HCl，pH7.9；10 μl 含 [^{3}H]-UTP 的核苷三磷酸混合液 (ATP、GTP、CTP 和 CP_{Na} 各 20 mmol/L，1μci [^{3}H]-UTP)；10μl CPKase (1 个活力单位)；20 μl 辅助因子混合液 (含 EDTA 和 DTT 各 10 mmol/L，$MnCl_2$ 50mmol/L，$(NH_4)_2SO_4$ 1mmol/L)；10 μl 变性小牛胸腺 DNA (含 20 μg，测沉淀部分酶活力时略去)；100μl 酶液。于 37℃ 反应 20—30 分钟，加入 2 ml 冰冷的 10% 三氯乙酸(含 60 mmol/L 焦磷酸钠)停止反应，于冰浴中放置 2 小时以上，将酸不可溶沉

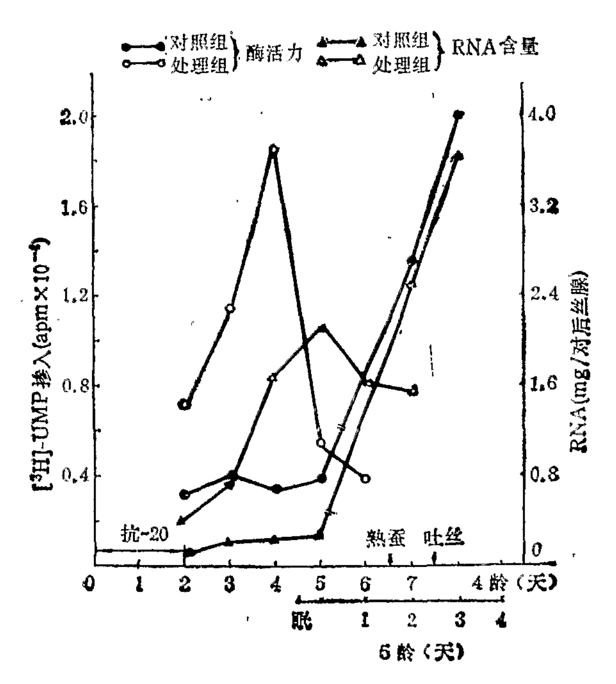


图1　家蚕后丝腺 RNA 聚合酶活力和 RNA 含量及抗-20 处理的影响酶活力：dpm/分钟/对后丝腺

淀经玻璃纤维滤片吸滤收集，依次用含焦磷酸钠的 10% 和 5% 三氯乙酸洗涤，用乙醇：乙醚(1:1V/V)和乙醚干燥。将滤片投入闪烁测量瓶中，加入 6 ml 闪烁液(含 0.7%PPO，0.02% POPOP 的二甲苯溶液)，于液闪计数器（YSJ-78 型)上测定。对照管在加入酶液前加入 2 ml 10% 三氯乙酸，其它与反应管相同，在本实验条件下，对照低于 100CPM/滤片。

五、蚕后丝腺 RNA 的提取　参照邹柏祥等(1980)。用含有 8-羟基喹啉-重蒸酚的缓冲液抽提，乙醇沉淀，于自动冰冻干燥仪（Hitachi 20 PR-520）上干燥，电子天平称量。

结　果

一、抗-20 处理对后部丝腺 RNA 聚合酶和 RNA 的影响

真核细胞 RNA 聚合酶绝大部分结合于细胞核。用超声波方法一般能使其分离开来，但此法引起家蚕聚合酶活力相当大的损失，因此采用分别测定上清液和沉淀部分酶活力，以两者之和作为总酶活力（Sridhara 等，1977)。本研究即用此法。

蚕在 4 龄开始的 48 小时连续取食抗-20 后，后丝腺 RNA 聚合酶活力即比对照组高

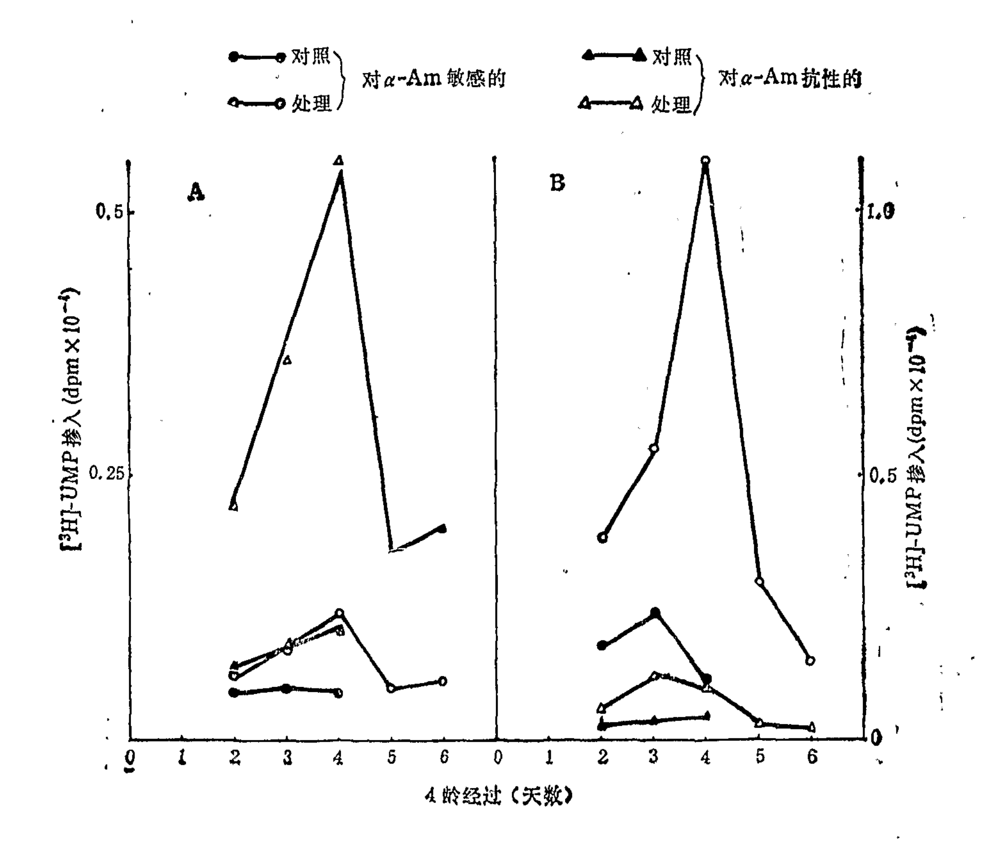


图 2　对 α-鹅膏蕈碱敏感的和抗性的 RNA 聚合酶活力及抗-20 处理后的影响
A. 17000 g 离心沉淀部分；　B. 105000 g 离心上清液
酶活力表示同图 1

1 倍，在 4 龄 4 天时，酶活力升到高峰，为对照组的 4 倍多。 对照组蚕在 4 龄期间酶活力一直处在低水平，但一当 4 眠起蚕进入 5 龄后，酶活力则呈直线上升。与此相应，处理蚕后丝腺 RNA 含量比对照的连续 4 天高 2—10 倍。

二、α-鹅膏蕈碱 (α-Am)对后丝腺 RNA 聚合酶体外转录活性的影响

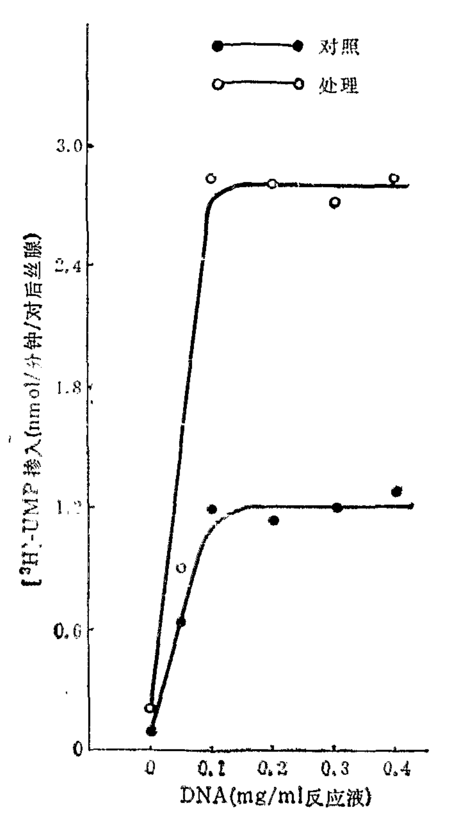


图 3 变性小牛胸腺 DNA 对 RNA 聚合酶转录活性的影响

α-Am(1×10^{-6}mol/L 以下) 对昆虫细胞核结合的 RNA 聚合酶 II 产生特异性抑制，而对聚合酶 I 没有影响，即聚合酶 I 对 α-Am 是抗性的，而聚合酶 II 对 α-Am 是敏感的 (Schenkel 等，1982)。

本实验中 α-Am 在反应系统中浓度为 1.2×10^{-6} mol/L，在与酶液预保温(25℃) 5 分钟后，加入含 [³H]-UTP 的核苷三磷酸混合液，于37℃反应 30 分钟。

图 2—A 显示出，17000 g 离心沉淀部分的酶活力中，对 α-Am 敏感的部分，处理组比对照组连续 3 天增加，最高达 1.7 倍；对 α-Am 抗性的部分，处理组比对照组连续 3 天增加约 2—6 倍。

与沉淀部分相反，105000 g 离心上清液部分对 α-Am 敏感的酶活力，处理组比对照组连续 3 天高 1—9 倍，对 α-Am 抗性的酶活力，处理组比对照组仅增加约 1 倍。无论是对照组还是处理组，对 α-Am 抗性的酶活力约占总酶活力的 10%，即酶活力被 α-Am 抑制了约 90%。

三、变性小牛胸腺 DNA 浓度与[³H]-UMP 掺入活性的关系

以 4 龄 3 整天蚕后丝腺的 105000 g 离心上清液为酶源，热变性的小牛胸腺 DNA 为模板，结果如图 3 所示。 当每毫升反应液中 DNA 浓度达到 0.1 mg 时，对照组和抗-20 组酶催化 [³H]-UMP 掺入均达到最大，也都

表 1 激素及其他化合物对沉淀部分转录活性的影响

激素或化合物	浓度 mol/L	[³H]-UMP 相对掺入活性(%)	
		对照组	处理组
——	——	100	100
抗-20	2×10^{-5}	101.1	106.0
ZR515	2×10^{-5}	102.1	103.3
20-羟基蜕皮酮	2×10^{-5}	101.5	107.0
放线菌素 D	1×10^{-5}	38.6	16.7
* 变性小牛胸腺 DNA		105.0	109.5

* 0.1mg/ml 反应液

相当于未加入 DNA 时的 13 倍。

四、一些激素和其它化合物对沉淀部分 [³H]-UMP 掺入活性的影响

分别取对照组 4 龄 3 天和处理组 4 龄 4 天蚕后丝腺的 17000 g 离心沉淀部分作为 DNA 模板复合物(结合有天然 DNA、RNA 聚合酶的细胞核或核碎片)，分别与表 1 中的化合物预保温(25℃)10 分钟，加入含 [³H]-UTP 的核苷三磷酸混合液于 37℃ 反应 20 分钟，其余操作与前述方法相同。从表 1 看出抗-20、ZR515 和 20-羟基蜕皮酮对 [³H]-UMP 掺入活性均不产生有意义的影响，虽然所用的 ZR515 和 20-羟基蜕皮酮浓度与其引起蚕体生理效应的处理剂量相当 (Tojo 等，1981；林浩等，1980)。由此看来，至少在体外，这些激素不直接作用于 DNA 模板复合物，而影响 RNA 的转录。放线菌素 D 对处理组和对照组的 [³H]-UMP 掺入活性分别抑制了 83% 和 61%。

讨　　论

前述结果显示出两组蚕的 105000 g 离心上清液 [³H]-UMP 掺入活性同样地依赖外源 DNA 和被 α-Am 强烈抑制 (图 2、3)。这表明所测 [³H]-UMP 掺入绝大部分为 RNA 聚合酶 II 所催化。由于真核细胞聚合酶 II 结合在核质上，因此上清液的酶是在匀浆中被机械张力剪下的。鉴于 RNA 聚合酶与单链的 DNA 结合部位无专一性，终止部位也无专一性，因此在过量的变性 DNA 存在下，[³H]-UMP 掺入速率主要依赖于 RNA 聚合酶量。

与上清液不同，17000 g 离心沉淀部分的 [³H]-UMP 掺入不依赖外源 DNA，被 α-Am 少量抑制，但被放线菌素 D 强烈抑制 (图 2 A、图 3、表 1)，这表明所测得的 [³H]-UMP 掺入量多半是结合在 DNA 模板上的 RNA 链经 RNA 聚合酶 I 催化的延伸。抗-20 处理后，[³H]-UMP 掺入明显增加，反映了后丝腺细胞核 RNA 转录能力的增强，其原因至少部分的是由于 RNA 聚合酶及其与 DNA 模板上特定部位结合的效率被诱导增加而造成。这也反映在 RNA 的合成上，随着 RNA 聚合酶活力的增加，后丝腺 RNA 的积累迅速上升，并在聚合酶峰后 1 天达到高峰，以后一天多蚕即吐丝作茧。显然，被诱导的 RNA 聚合酶和 RNA 直接参与丝蛋白基因的表达。

咪唑类化合物的作用方式是相当复杂的，在不同条件下显示不同的生理效应。在 4 龄早期应用 KK-42 或抗-20，均明显抑制正常蚕 4 龄前中期的 MH 峰 (Yamashita 等 1987)，导致蚕早熟结茧。但在 3 龄期应用抗-20，蚕不能在当龄早熟结茧 (庄大桓等，1988)，这意味着蚕成熟结茧需要有一个发育的最低临界期。由于 KK-42 诱导的早熟效应能被 JHA、ZR515 完全抵消，因此认为 KK-42 是一种抗保幼激素 (Kuwano 等，1985)。而在特定的条件下，抗-20 产生与 JHA、738 完全一致的生理作用。因此对咪唑类化合物如何影响蚕体 JH、MH 或其他激素的水平，如何导致早熟结茧和变态，值得深入研究。

参　考　文　献

庄大桓等　1988　"抗-20"诱导三眠蚕的效果及其对茧丝质量的影响。蚕业科学 14(1)：37—8。
陆雪芳等　1985　抗保幼激素类似物诱导三眠蚕试验简报。蚕业科学 11(3)：181—2。

林浩等 1980 保幼激素类似物对蚕合成甘氨酸和丙氨酸有关酶系的调节控制。生物化学与生物物理学报 12(4): 321—9。

邹柏祥等 1980 蓖麻蚕后丝腺和脂肪体核糖核酸的分离和活性测定。昆虫学研究集刊第一集第7—12页。上海科学技术出版社。

Kiuchi, M. et al 1985 Induction of trimolters from a tetramolter strain of *Bombyx mori* by anti-juvenoid treatment. *J. Seric. Sci. Jpn.* 54(1): 77—81.

Kuwano, E. et al 1985 Synthesis and anti-juvenile hormone activity of 1-substituted-5-[(E)-2, 6-dimethyl-1, 5-heptadienyl] imidazoles. *Agric. Biol. Chem.* 49: 483—6.

Riddiford, L. M. 1985 Hormone action at the cellular level. In "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology" ed. Kerrut, G. A. and Gilbert, L. I. Pergamon, Oxford, Vol. 8 p. p. 37—84.

Steele, J. E. 1985 Control of metabolic processes. In "Conprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology". eds. by G. A. Kerkut and L. I. Gilbert Prrgamon Press. Vol. 8 p.p. 99—145.

Schenkel, H. et al 1982 RNA polymerase activities of *Calliphora vicina* larvae in response to ecdysteroids. *Insect Biochem.* 12(5): 523—30.

Sridhara, S. et al 1977 RNA polymerase and RNA synthesis in the silkglands of the silkworm, *Bombyx mori*. *Eur. J. Biochem.* 72: 331—9.

Tojo, S. et al 1981 Hormonal control of storage protein synthesis and uptake by the fat body in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 27: 491—7.

Yamashita, O. et al 1987 An imidazole compound as a potent anti-ecdysteroid in an insect. *Agric. Biol. Chem.* 51: 2295—7.

INDUCTION OF DNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE AND RNA SYNTHESIS BY "KANG-20" TREATMENT IN THE SILKWORM, *BOMBYX MORI*

LIN HAO CHEN DAN-ZHEN ZHU XIANG-XIONG HOU NENG-JUN

(Shanghai Institute of Entomology, Academia Sinica Shanghai 200025)

CHEN GUO-HU ZHUANG DA-HUAN

(The Sericulture Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018)

Trimolter larvae were efficiently induced from a tetramolter strain of *Bombyx mori* by feeding "Kang-20" to the larvae during the first 48 hours of the 4th instar and could spin smaller cocoons. RNA polymerase I and II activities in the posterior sikgland ere determined on the basis of α-Amanitin sensitity, Actinomycin D inhibition, DNA requirement and [^{3}H] UMP incorporation into acid-insoluble material. It was observed that after "Kang-20" treatment class I and II polymerase activities transcribed on hot-denatured calf thymus DNA and endogenous DNA rised rapidly with duration of the 4th instar and reached a maximum level on the 4th day of the instar. The enzyme stimulation was in good gareement with the increase of RNA contents in the posterior silkgland. But in the control the enzyme activity and RNA content remained at a rather low and stable level.

These results indicate that increased transcriptional activity in the posterior silkgland cells is at least partly due to *de novo* synthesis of RNA polymerase and enhanced nuclei template capacity by "Kang-20" treatment.

Key words *Bombyx mori*——RNA polymerase——"Kang-20" trimolter inducer